

К. С. Казначеев¹, Н. А. Сметанникова², Т. Н. Поспелова¹,
В. А. Белявская², В. Д. Злобина³

¹ Новосибирский государственный медицинский университет
Красный просп., 52, Новосибирск, 630091, Россия

² Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор»
пос. Кольцово, Новосибирская обл., 630559, Россия

³ Новосибирский областной детский онкогематологический центр
пос. Краснообск, Новосибирская обл., 630501, Россия
E-mail: kaznatcheev@mail.ru

ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНА *XRCC1* У ДЕТЕЙ С ОСТРЫМ ЛИМФОБЛАСТНЫМ ЛЕЙКОЗОМ

Проведено определение полиморфизма гена *XRCC1* по локусу *Arg399Gln* у детей с острым лимфобластным лейкозом (ОЛЛ). Выявлено накопление гомозигот *Gln / Gln (XRCC1)* у лиц с комбинациями *M/M – W/M – W/M p53*. Полученные данные свидетельствуют о значительных изменениях в системе *p53* у детей, страдающих ОЛЛ.

Ключевые слова: лейкоз, дети, полиморфизм генов.

Современные представления о патогенезе и подходах к терапии злокачественных опухолей сочетают в себе не только информацию о различных особенностях опухолевых клеток, но и оценку индивидуальной реакции организма на цитостатические средства, составляющие основу противоопухолевой терапии.

Лейкозы являются первичным опухолевым заболеванием костного мозга, при котором патологические клетки, поражая костный мозг, распространяются не только по органам кроветворения, но и в ЦНС, другие системы. Показатель заболеваемости лейкозом в различных регионах России на 100 000 детского населения за последние 10 лет составил 2,8–3,2 случаев в год. Наиболее часто острые лейкозы (ОЛ) выявляются в возрасте от 2 до 6 лет (так называемый «младенческий пик»). Многие факты, накопленные наукой за последние 20 лет, говорят о том, что состояние внутриклеточной системы контроля апоптоза играет важную роль в предрасположенности различных групп людей к развитию неоплазий. Молекулярно-биологические исследования выявили значительную вариабельность активности многих белков, играющих ключевую роль в процессах регуляции клеточной смерти. Иногда колебания активности обу-

словлены присутствием ингибиторов или активаторов [1]; другим классическим распределением активности белков в популяции является бимодальность при практическом отсутствии интраиндивидуальной вариабельности. Этот вариант обычно наблюдается как следствие генетического полиморфизма определенных ферментов. Генетический полиморфизм охарактеризован для белков как ранней, так и поздней фазы апоптоза [2].

Мутантные аллели часто обеспечивают формирование неполноценных белков, что приводит к снижению или отсутствию специфической активности [3; 4]. Вариантные аллели гетерогенно распределены в различных популяциях: 1 % арабов, 5–8 % белого населения и до 30 % представителей азиатской расы имеют гомозиготность или сочетанную гетерозиготность по мутантным аллелям *XRCC1*.

Очень важной для клетки (и для канцерогенеза) является ее способность воссоединять случайные двойные разрывы (ДР) ДНК, что осуществляется двумя различными репарационными механизмами: негомологическим воссоединением концов (НГВК) ДНК и путем гомологической рекомбинации (ГР) при наличии по соседству второй копии неповрежденного идентичного по

нуклеотидной последовательности сегмента ДНК, например сестринской хроматиды. Поскольку в диплоидных ядрах гомологичные хромосомы пространственно разделены (хромосомные территории), репарация путем ГР преимущественно происходит в S- и G2-фазах клеточного цикла, а НГВК осуществляется во время любой фазы цикла. В геномах высших эукариот имеется много повторов, по которым возможна репарация путем ГР, однако такая репарация ДР практически полностью подавлена и приводит к хромосомным транслокациям. Главным механизмом подавления потенциально кластогенной ГР между повторами и неправильного (эктопического) воссоединения концов ДНК при репарации ДР является, по-видимому, локальная специфическая модификация хроматина по гистону *H2AX* – фосфорилирование лизина-139 (или образование γ -*H2AX*) [5; 6].

Наиболее изученной системой репарации ДНК является эксцизионная репарация нуклеотидов (ЭРН). При ЭРН модифицированные нуклеотиды (например, пиримидиновые димеры) удаляются из поврежденной нити благодаря действию нуклеаз *XPG* и *ERCC1/XPF*, а образующийся при этом однотяжевый пробел заполняется ДНК-полимеразами *d* или *e* с помощью *PCNA* и зашивается ДНК-лигазой. Белок *XRCC1* (*X-ray-repair-cross-complementing*) не обладает каталитической активностью, но служит структурным белком в системе эксцизионной репарации оснований. Взаимодействуя N-концевым доменом с ДНК-полимеразой и C-концевым доменом с ДНК-лигазой III, он способствует замещению полимеразы лигазой и стимулирует реакцию лигирования. Клеточные линии с дефектным геном *XRCC1* проявляют высокую чувствительность к рентгеновскому излучению и имеют большое количество нерепарированных однонитевых разрывов [7].

У мышей инактивирующие гомозиготные мутации генов ДНК-полимеразы β , *APE1/REF1*, *LIG1* и *XRCC1* приводят к эмбриональной летальности. Дефекты в генах системы репарации приводят к нестабильности микросателлитных сегментов и к мутациям по различным генам, в том числе и по генам опухолевых супрессоров [7].

Популяционные исследования подтверждают, что частота выявления определен-

ных мутаций зависит от региона, в котором проводилась выборка группы. Следует отметить, что в Европе наблюдается северо-южный градиент снижения частоты вариантов аллелей *XRCC1* [8].

В исследованиях, направленных на выявление ассоциации между вариантами генотипа *XRCC1* и частотой лимфом и лейкозов [8], выявлена более высокая частота нормального аллеля у взрослых пациентов с лейкозами и отсутствие ассоциации генотипа и развития лимфогранулематоза и неходжкинских лимфом [9]. Другие результаты [10] не отражают корреляции генотипа D6 с частотой острого лимфобластного лейкоза (ОЛЛ) у детей.

Пациенты с ОЛЛ обычно получают лечение согласно группам риска, определяемым по прогностическим факторам, по протоколу, включающему системную полихимиотерапию и специфическую профилактическую терапию для предотвращения поражения ЦНС. К факторам, определяющим продолжительность полной ремиссии и потенциально полное излечение, отнесен ряд прогностических переменных: возраст пациента, уровень лейкоцитов крови и биологические свойства лейкозных клеток (гистохимическая, морфологическая, иммуногистохимическая, цитогенетическая характеристика). Интенсивность режима индукции ремиссии основана на классификации, отражающей риск развития рецидива, определенного на основе анализа прогностических факторов. Этот подход, используемый для дифференцировки инициальной терапии, позволяет уменьшить токсический эффект и существенно увеличивает выживаемость.

При ОЛЛ клетки классифицируются по морфологическим критериям French–American–British (FAB). Использование этой схемы показывает, что у 80–85 % детей с ОЛЛ клетки имеют L1 или L2 морфологию. В большинстве исследований L1 морфология ассоциируется с лучшим прогнозом.

Имеют T-клеточный фенотип 15 % детей с ОЛЛ и требуют изначально более интенсивного лечения: T-клеточный ОЛЛ CD2 свидетельствует о благоприятном прогнозе, в то время как CD7+, CD2, и CD5 иммунофенотип – «протимоцит» – определяет менее благоприятный прогноз.

Около 80 % пациентов имеют лейкозные клетки предшественников В-лимфоцитов и «cALLa» CD10 антиген. Существуют три главных подтипа В-клеток при ОЛЛ: ранние pre-B, pre-B и В-клетки. Приблизительно 2/3 пациентов имеют ранний pre-B фенотип и прогностически самую лучшую перспективу. Когда pre-B фенотипу сопутствует хромосомная t(1; 19) транслокация, прогноз по сравнению с ранним pre-B ОЛЛ ухудшается. Достаточно редко (у 1 % пациентов) выявляется иммунофенотип В.

Как аллели «дикого» типа, так и мутантные могут играть защитную роль или быть фактором риска развития опухоли, что отражает вариабельность физиологической роли фермента. Необходимо, однако, иметь в виду, что только 5 % генома кодирует белки и требует точного воспроизведения во время репликации, поэтому мутации в 95 % генома (в некодирующей ДНК), особенно в дифференцированных соматических клетках, редко приводят к заметным фенотипическим эффектам. Что касается половых и стволовых клеток, то в них повреждения ДНК должны легче индуцировать апоптоз, а не репарацию.

С целью уточнения механизмов развития опухолевого процесса и прогноза заболевания проводилось определение полиморфизма гена XRCC1 по локусу Arg399Gln, изолированно или в комбинации с другими функционально значимыми изменениями генов-регуляторов апоптоза (p53 и CCR5).

Материал и методы

Исследовались мононуклеарные лейкоциты периферической крови детей, страдающих ОЛЛ, в период между постановкой диагноза и до начала противоопухолевой терапии. Забор крови проводился в стерильных условиях с последующим выделением мононуклеарной фракции циркулирующих клеток на фиколлово-градiente. Обследовано 32 ребенка (13 мальчиков, 19 девочек) в возрасте от 2 мес до 14 лет. Среднее количество лейкоцитов периферической крови на момент постановки диагноза составляло $63,5 \pm 0,23 \times 10^6/\text{л}$. Доля бластных клеток составляла $83,5 \pm 7,2\%$. Все больные проходили обследование и лечение по протоколу ALL-MB2002. Определение

полиморфизма XRCC1 (Arg399Gln), p53 (Arg72Pro по экзону 4, dupl6 bp по интрону 3 и MspI по интрону 6) проводилось посредством PCR-RFLP-анализа.

Результаты анализировались для всей группы пациентов с лейкозом из предшественников В-клеток (BCP ОЛЛ) и (pre-) Т-ОЛЛ, а также для всех пациентов в соответствии с группами риска. Статистический анализ проведен с применением программы «SPSS for Windows» 9.0.

Результаты исследования и обсуждение

Используя методологию множественной полимеразной цепной реакции и рестрикции фрагмента в области полиморфизма, проанализированы аллельные варианты гена XRCC1 в кодонах 399 (аргинин и глутамин) – (399 глутамин). Распределение изменений гена XRCC1 Arg399Gln в популяции по собственным данным характеризуется следующим образом: 33,5 % Arg / Arg, 52,8 % Arg / Gln, 13,5 % Gln / Gln (обследовано 196 здоровых детей 4–10 лет).

У детей, страдающих ОЛЛ, доля гетерозиготной группы Arg / Gln значительно снижена (3,36 %), что составляет достоверную разницу по сравнению с популяцией ($p < 0,05$).

Анализ комбинаций изменений генотипа выявил увеличение доли лиц:

1) с комбинацией Gln / Gln (XRCC1) и Pro / Pro (p53 codon 72) по сравнению с популяцией (OR = 10,23, 95 % CI 6,93–13,61);

2) с комбинацией Gln / Gln (XRCC1) и M / M (отсутствие сайта рестрикции MspI по интрон 6 гена p53) по сравнению с популяцией (OR = 9,85, 95 % CI 6,66–13,1);

3) с комбинациями M / M – W / M – W / M p53, положительно ассоциированной с «life expectancy» (Pro / Pro по кодону 72 экзона 4, W / dup 16bp по интрон 3, MspI W / M по интрон 6), связанной с наличием генотипа Arg / Gln XRCC1, (OR = 9,54, 95 % CI 6,46–12,69, respectively).

Сравнительный анализ частоты встречаемости гаплотипа p53 W-W-M (Arg по кодону 72 экзона 4, отсутствие dupl6 bp по интрон 3, отсутствие MspI restriction site по интрон 6) у гетерозигот по одному из локусов, показал статистически значимое накопление гаплотипа p53 W-W-M среди

больных ОЛЛ по сравнению с популяцией (OR = 4,7, 95 % CI 1,95–7,8).

Увеличение числа пациентов, имеющих одновременно измененные гены, управляющих как процессом репарации ДНК (XRCC), так и запуском одного из основных механизмов апоптоза (*p53*), многократно увеличивает шансы закрепления изменений генотипа в делящихся клетках, что может привести к началу опухолевого процесса.

Не получено корреляционной связи между исходом инициальной терапии и вариантами гаплотипа *p53* (98 % больных достигли ремиссии, срок наблюдения больных в ремиссии составлял 3–16 мес). Не удалось обнаружить достоверной разницы в исследуемой группе по общепринятым факторам прогноза: распределение по полу, иммунофенотипу бластных клеток; по возрасту констатации заболевания, уровню лейкоцитоза и абсолютного количества бластных клеток в анализе периферической крови.

Таким образом, в случае ОЛЛ у детей общепринятые факторы прогноза не могут полностью определить индивидуальную эффективность и токсичность терапии. Предпринимаются попытки использования дополнительных показателей в качестве прогностических факторов. Характеристики организма-хозяина, в частности, обнаружение гаплотипов, обеспечивающих формирование неполноценных белков со сниженной специфической активностью, способные повлиять на чувствительность к терапии онкологических заболеваний, несомненно, заслуживают дополнительного изучения.

Список литературы

1. *Competition* between cytochrome P-450 isozymes for NADPH-cytochrome P-450 oxidoreductase affects drug metabolism / D. Li, M. Pritchard, S. Hanlon et al. // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1999. Vol. 289. P. 661–667.
2. *A systematic review of genetic polymorphisms and breast cancer risk* / A. Dunning, C. Healey, P. Pharoah et al. // *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 1999. № 8. P. 843–854.

3. *Genetic analysis of the CYP2D6 locus in a Hong Kong Chinese population* / M. Garcia-Barcelo, L. Chow, H. F. K. Chui et al. // *Clin. Chem.* 2000. Vol. 46. P. 18–23.

4. *Reconstitution of DNA base excision-repair with purified human proteins: interaction between DNA polymerase beta and XRCC1 protein* / Y. Kubota, R. A. Nash, A. Klungland et al. // *EMBO J.* 1996. Vol. 15, № 23. P. 6662–6670.

5. *Polymorphism of the cytochrome P450 2D6 gene in a European population: characterization of 48 mutations and 53 alleles, their frequencies and evolution* / D. Marez, M. Legrand, N. Sabbagh et al. // *Pharmacogenetics.* 1997. Vol. 7. P. 193–202.

6. *Nocentini S. Rejoining kinetics of DNA single- and double-strand breaks in normal and DNA ligase-deficient cells after exposure to ultraviolet C and gamma radiation: an evaluation of ligating activities involved in different DNA repair processes* // *Radiat. Res.* 1999. Vol. 151, № 4. P. 423–432.

7. *Requirement for the XRCC1 DNA base excision repair gene during early mouse development* / R. S. Tebbs, M. L. Flannery, J. J. Meneses et al. // *Dev. Biol.* 1999. Vol. 208, № 2. P. 513–529.

8. *Genetic polymorphism of CYP2D6, GSTM1 and XRCC1 and susceptibility to haematological neoplasias* / M. Lemos, F. Cabrita, R. Ryan et al. // *Carcinogenesis.* 1999. Vol. 20. P. 1225–1229.

9. *Prevalence of the inactivating 609 C_T polymorphism in the NAD(P)H: quinone oxidoreductase (NQO1) gene in patients with primary and therapy-related myeloid leukemia* / R. Larson, Y. Wang, M. Banerjee et al. // *Ibid.* Vol. 94. P. 803–807.

10. *Susceptibility to childhood acute lymphoblastic leukemia: influence of CYP1A1, CYP2D6, GSTM1, and GSTT1 genetic polymorphisms* / M. Krajcinovic, D. Labuda, C. Richer et al. // *Blood.* 1999. Vol. 93. P. 1496–1501.

Материал поступил в редколлегию 15.07.2006

K. S. Kaznacheev, N. A. Smetannikova, T. N. Pospelova, V. A. Belyavskaya, V. D. Zlobina

Polymorphism of gene XRCC1 at children with acute lymphoblastic leukemia

Definition of polymorphism of gene *XRCC1* on locus *Arg399Gln* at children with acute lymphoblastic leukemia is lead. Accumulation of homozygotes *Gln/Gln* (*XRCC1*) at persons with combinations *M/M* – *W/M* – *W/M* *p53* is revealed. The received data testify to appreciable changes in system *p53* of children suffering leukemia.

Keywords: leukemia, children, polymorphism of genes.